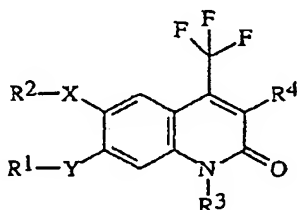




<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C09K 11/00</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/66680</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. November 2000 (09.11.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT00/00105</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 28. April 2000 (28.04.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: A 775/99 30. April 1999 (30.04.99) AT</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: URAY, Georg [AT/AT]; Vogelweiderstrasse 15, A-8010 Graz (AT).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NIEDERREITER, Karlheinz [-/AT]; Radetzkystrasse 9, A-8010 Graz (AT).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht</p> <p><i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>

(54) Title: LUMINESCENT 4-TRIFLUOROMETHYL-2-QUINOLONES WITH LONG-WAVE UV-ABSORPTION AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: LUMINESZIERENDE 4-TRIFLUORMETHYL-2-CHINOLINONE MIT LANGWELLIGER UV-ABSORPTION UND IHRE VERWENDUNG



(1)

(57) Abstract

The invention relates to a substituted 4-trifluoromethyl carbostyryl according to formula (I) and is characterised in that the 4-trifluoromethyl carbostyryl is provided with an absorption maximum between 350 and 420 nm and a luminescence maximum between 430 and 900 nm. The molecule can be substituted with groups that are useful for complexing metal ions and/or for binding the molecule to relevant groups of a target molecule or a solid supporting material. The carbostyryl as described above can *inter alia* serve as an antenna molecule of a lanthanide complex. Said complexes can be templates and can be brought into contact with a directly bound or free colour molecule which absorbs in the range of 580–710 nm. Luminescence effects and decay periods can be measured after the contact with a relevant analyte.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein substituiertes 4-Trifluormethylcarbostyryl gemäß obiger Formel (I), dadurch gekennzeichnet, daß es ein Absorptionsmaximum zwischen 350 und 420 nm und ein Lumineszenzmaximum zwischen 430 und 900 nm aufweist. Das Molekül kann mit Gruppen substituiert sein, die zur Komplexbildung von Metallionen und/oder zur Bindung des Moleküls an passende Gruppen eines Zielmoleküls oder festen Trägermaterials geeignet sind. Das oben beschriebene Carbostyryl kann unter anderem als Antennenmolekül eines Lanthanidenkomplexes dienen. Diese Komplexe können zusätzlich mit einem direkt gebundenen oder freien Farbstoffmolekül, absorbierend im Bereich 580–710 nm, als Template in Kontakt gebracht werden und nach Kontakt mit einem geeigneten Analyten können Lumineszenzeffekte und Abklingzeiten gemessen werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Lumineszierende 4-Trifluormethyl-2-chinolinone mit langwelliger UV-Absorption und ihre Verwendung

Beschreibung

Lumineszierende Cumarine haben weite Verbreitung als Photosensitizer, Laser-Farbstoffe oder pH-Indikatoren in der Biochemie und Medizin gefunden. Es gibt daher zahlreiche experimentelle und theoretische Daten über die Lumineszenzcharakteristik, Photophysik und Photochemie von Cumarin-Derivaten. Über die ähnliche Anwendung der chemisch eng verwandten 2-Chinolinone (Carbostyrile), die als Aza-Analoga der Cumarine angesehen werden können und ebenfalls lumineszieren, gibt es vergleichsweise wesentlich weniger Anwendungsdaten in der Literatur. Dabei wären gerade Carbostyrile photostabiler und chemisch inerte als die Cumarinderivate. Dieser relative Mangel an Anwendungen als Lumineszenzmarker ist zum Teil darauf zurückzuführen, daß es in scharfem Gegensatz zu den Cumarinen trotz hunderter bekannter Carbostyrylderivate bisher offenbar nicht gelungen ist, die Absorptionswellenlänge gegenüber der unsubstituierten Form (330 nm) wesentlich über den Wert von 350 nm hinaus in den längerwelligen Bereich zu verschieben und gleichzeitig eine starke Erhöhung der Lumineszenzquantenausbeute zu erzielen. Bei Cumarin, das unsubstituiert kurzwelliger als Carbostyryl absorbiert, gelingt dies leicht durch Einführung von elektronenliefernden Amino oder Ether Substituenten, hauptsächlich in Position 7. Im Gegensatz dazu wird beispielsweise in der Serie der 4-Methylcarbostyryle das in Dimethylsulfoxid gemessene langwellige UV Absorptionsmaximum von 331 nm

durch eine zusätzliche Methoxy-Funktion in Position 7 sogar zu etwas kürzeren Wellenlänge (328 nm) verschoben.

Die Herstellung von photostabilen und stark lumineszierenden Carbostyrylen mit Absorptionsmaxima über 350 nm wäre durch die effizientere Ausblendung von störenden, kurzwelliger absorbierenden Fremdfluorophoren in komplexer Matrix von wesentlichem Interesse. Bedeutende Anwendungen in der Meßtechnik werden sich für langwelliger absorbierende Carbostyryle durch seit kurzem kommerziell erhältliche äußerst preiswerte LEDs ergeben, die im nahen UV Bereich bei etwa 370 nm emittieren und daher in naher Zukunft gerade in der Sensorentwicklung eine starke Rolle spielen werden.

Das Interesse an lumineszierenden Farbstoffen hat sich in jüngster Zeit auf analytische Anwendungen in der Biochemie konzentriert. Zu den vielversprechendsten Anwendungen gehört der Gebrauch solcher Chromophore für die Herstellung von Lanthaniden-Chelaten, davon vor allem solchen mit Europium- und Terbiumionen. Zu den verwendeten Chromophoren gehören unter anderem bereits bestimmte Carbostyryle, insbesondere N-Acylderivate des 7-Amino-4-methyl-2(1H)-chinolinons ("carbostyryl 124). Dieses wurde von M. Li und P. R. Selvin beispielsweise in J. Am. Chem. Soc., 117 (1995) 8132 und Bioconjugate Chem., 8 (1997) 127 beschrieben. Die Anregung erfolgt hierbei bei 337 nm. Die Möglichkeit von zeitaufgelösten Messungen der langwelligeren Lanthanidenemission macht solche Komplexe besonders in biologischen Systemen attraktiv. Sie können zum Beispiel als günstige Alternativen zu den radioaktiven Markierungen (Radioimmunoassays, RIA) und einfachen Fluoroimmunoassays (FIA) Anwendung finden. Bereits eine Routinemethode stellt

der sogenannte DELFIA®-Test (dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay) dar. Eine weitere Anwendung der zeitaufgelösten Messung von Lanthanidenkomplexen stellt die Verwendung dieser Chelate als Fluoreszenzmarker durch kovalente Bindung an Analyten in biologischer Matrix dar.

Beschreibung der Erfindung

Die gegenständliche Erfindung löst das Problem der Bereitstellung von langwellig absorbierenden und stark lumineszierenden Carbostyrilen mit UV-Maxima über 350 nm durch die Einführung eines ganz bestimmten Substituentenmusters der generellen Formel I. Es handelt sich dabei um 4-Trifluormethyl substituierte Chinolin-2-one mit essentiell zwei über Sauerstoff oder Stickstoff gebundenen Substituenten oder Funktionalitäten in Position 6 und 7, die in Summe langwellige Absorptionsmaxima über 350 nm und hohe Emissionsquantenausbeuten in Kombination mit hinreichenden Stoke-Verschiebungen bewirken. Dies war in Hinsicht des langwelligsten Maximums durch die an sich eher nachteilige Wirkung einer Methoxygruppe allein in Position 7 (wie oben beschrieben) nicht vorherzusehen.

In einer derartigen Struktur I können ohne bedeutende Änderung der Lumineszenzeigenschaften beispielsweise in Position 1 und 3 zusätzliche Substituenten vorhanden sein, die zur Einführung verschiedener weiterer Funktionalitäten geeignet sind. Ebenso können in Position 6 und 7 die Reste R1 und R2 nützliche Funktionen tragen, die zur Komplexierung eines Metallions oder zur Bindung an reaktionsfähigen Analyten oder zur Immobilisierung an festen Materialien geeignet sind.

Das Potential von Verbindungen der Formel I wird erfindungsgemäß durch die Bindung diverser Seitenketten und Funktionalitäten und die Messung der Absorptionseigenschaften sowie der Lumineszenzcharakteristik erläutert. Die Seitenketten erlauben zum Beispiel die komplexartige Bindung von Europium(III)

Ionen sowie die Immobilisierung dieser Komplexe an einem Analyten oder an einer festen Matrix. Beispielsweise führt die Nitrrierung des 4-Trifluormethyl-6,7-dimethoxycarbostryls zum 3-Nitroderivat, das nach Reduzierung das entsprechende 3-Aminoderivat ergibt. Eine N(1)-Methylierung der Nitroverbindung und nachfolgende Reduktion zur analogen N(1)-Methyl-3-aminoverbindung oder N(1)-benzyl-3-aminoverbindung oder der N(1)-phthalimidomethylverbindung ändert die spektralen Eigenschaften nur unwesentlich. Auch die Position 1 ist daher zum Binden weiterer Funktionen, die zum Beispiel später zu einer Immobilisierung führen können, geeignet. Beispielsweise kann aber schon das 3-Amino-4-trifluormethyl-6,7-dimethoxycarbostryl mit einem geeigneten Dianhydrid (z.B. Diethylentriaminpentaacetat dianhydrid "DTPA") in Position 3 am Stickstoff acyliert werden. Nach Hydrolyse entsteht eine Tetracarbonsäure, die sich leicht mit Europiumionen komplexieren läßt. Alternativ kann man vor der Hydrolyse des Anhydrids mit einem geeigneten Amin an der zweiten Anhydridfunktion einen Linker durch Amidbildung anbringen, der seinerseits den fertigen Komplex an einen Analyten oder an einen weiteren Chromophor oder auch an eine feste Matrix zu binden vermag. Die Komplexbildung mit Lanthanidenionen kann je nach Bedarf vor oder nach der Fertigstellung des Gesamtmoleküls erfolgen. Es ist nach Struktur I, den obigen Erläuterungen sowie den unten angeführten Beispielen offensichtlich, daß komplexbildende Seitenketten an einer der mit R bezeichneten Stellen des Moleküls zu Verbindungen führen, die immer noch die erfindungsgemäße Charakteristik einer gewünschten UV-Absorption über 350 nm aufweisen.

Die grundlegenden photophysikalischen Eigenschaften der mit Eu^{3+} komplexierten beispielsweise Verbindung (III) und des zugrundeliegenden Chromophors (I) sind in Abbildung (a) und im experimentellen Teil der Beispiele wiedergegeben. Daraus ist klar ersichtlich, daß nach Anregung bei 370 nm bei den Europiumkomplexen neben der starken Eigenfluoreszenz des Carbostyrils eine ausgeprägte Übertragung der Anregung auf das komplexierte Europiumion stattfindet (sogenannte Antennenwirkung). Eine derartige Übertragung der Anregungsenergie auf Europium ist bei dieser hohen Absorptionswellenlänge, also nach Einstrahlung von Licht mit Wellenlängen über 370 nm, bisher kaum beobachtet worden. Der bisher hauptsächlich als wirksam angesehene Bereich lag etwa zwischen 300 und 350 nm. Europiumionen selbst lumineszieren allein, also ohne Übertragungschromophor, nur äußerst schwach.

Aus den Beispielen ist auch ersichtlich, daß ein zusätzlich kovalent gebundener oder auch nur beigemengter Farbstoff mit anderer Absorptionswellenlänge (zB. 550nm) diesen Vorgang nicht stört. Im Gegensatz dazu wirkt ein Farbstoff, der im Bereich der Europiumemission (570-710nm) absorbiert, dynamisch quenchend (Lumineszenzintensität und -abklingzeit sinken) und ermöglicht daher den Aufbau eines nahezu beliebigen Sensors. Es muß nur die Bedingung erfüllt sein, daß ein derartiger zusätzlicher Farbstoff als Indikator für die zu messende Veränderung, wie zum Beispiel die Wasserstoffionenkonzentration, wirkt. Ähnliche Effekte ergeben sich natürlich auch durch Protonierung/Deprotonierung des Carbostyrlchromophors an der Carbonylfunktion oder einem direkt an das Carbostyryl gebundenen Stickstoffatom, denn damit werden seine spektralen Eigenschaften und folglich seine Antennenwirkung verändert. Zeitaufgelöste

Messung des Emissionsspektrums nach etwa einer Mikrosekunde zeigt ausschließlich Europiumbanden (ohne kurzlebiger Untergrundfluoreszenz), deren Abfall in einer Zeitspanne von etwa 2 Millisekunden ebenfalls zum Meßprinzip werden kann. Dies beweist die Anwendbarkeit dieses Komplextyps für zeitaufgelöste Lumineszenzmessungen auch bei stark fluoreszierendem Untergrund.

Beispiele

Beispiel 1

6,7-Dimethoxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon und das analoge ringgeschlossene 6,7-Methylenedioxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon:
8.5 g Trifluormethylacetessigester werden mit 1.77g 3,4-Dimethoxyanilin versetzt und 30 min zum Sieden erhitzt. Der gebildete Alkohol und überschüssiges Reagens werden abdestilliert, es werden 5ml halbkonzentrierte Schwefelsäure zugegeben und 10 min auf 100 Grad C erhitzt. Die Mischung wird auf Wasser gegossen und der gebildete Niederschlag wird aus Ethanol umkristallisiert.
Ausbeute 80% , Fp. 272 Grad C, UV λ max 367nm, emissions maximum 440 nm (DMSO), IR, (KBR) CO: 1675 cm⁻¹. Analog kann aus 3,4-Methylenedioxyanilin die Verbindung 6,7-Methylenedioxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon hergestellt werden. Fp. 288-290°C, UV λ max 367nm (DMSO), Emissions max 438 nm (DMSO), IR (KBR) CO: 1675 cm⁻¹.

Beispiel 2

6,7-Dimethoxy-3-nitro -4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon:
3.5g 6,7-Dimethoxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon werden mit 50 ml einer halbkonzentrierten Mischung von Salpetersäure und Schwefelsäure unter Eiskühlung nitriert. Die Mischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und auf Wasser gegossen. Der gebildete Niederschlag wird mit Flash-Chromatographie

gereinigt (Kieselgel, Dichlormethan-Aceton 9:1) . Ausbeute 70%, Fp 270 °C, UV λ max 391nm (DMSO), IR (KBr) CO: 1670cm⁻¹.

Beispiel 3

3-Amino-6,7-dimethoxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon:

1.1g 6,7-Dimethoxy-3-nitro -4-Trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon in 200 ml Ethanol werden 24 Stunden bei 50°C und 3 bar Wasserstoffdruck mit Platin (IV) oxid reduziert. Aus Toluol resultieren 0.83g (85%) Aminoverbindung. Fp 221°C, UV λ max 350nm (DMSO), Emissions max 431nm (DMSO), IR (KBr) 3520, 3405 (NH₂); 1620 (CO).

Beispiel 4

6-Amino-7-methoxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon und das

6-Amino-7-hydroxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon:

3g Trifluormethylacetessigester werden mit 0.60g 3-Methoxy-4-nitroanilin versetzt und 30 min zum Sieden erhitzt. Der gebildete Alkohol wird abdestilliert und der bei Raumtemperatur gebildete Niederschlag abgesaugt. Ausbeute: 0.83g (76%) 4,4,4-Trifluoracetoacetyl-3-methoxy-4-nitroanilid. 0.83g 4,4,4-Trifluoracetoacetyl-3-methoxy-4-nitroanilid werden portionsweise in 11,5g 110°C heiße Polyphosphorsäure eingeführt und 30 min bei 115°C gerührt. Danach wird auf Wasser gegossen und der gebildete Niederschlag aus Ethanol umkristallisiert. Ausbeute: 0.26g (33%), Fp 273-75°C (EtOH, dec). 7-methoxy-6-nitro-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon. 0.26g dieser Verbindung werden in 30mL Ethanol suspendiert und 20 Stunden bei 40°C mit H₂/PtO₂ (3 bar Wasserstoffdruck)

reduziert. Das isolierte Rohprodukt wird mit Flash-Chromatographie gereinigt (Kieselgel, Toluol-Aceton 1:1) . Ausbeute: 0.183g (82%). Fp 238°C (Toluol, dec), UV λ max 400 nm (DMSO), emissions max 517nm (DMSO), IR (KBr) 3410, 3320 (NH₂); 1670 (CO).

Etherspaltung mit konzentrierter HBr führt zur Hydroxyverbindung

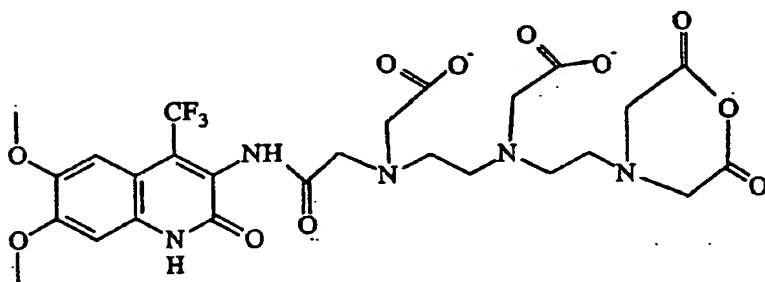
6-Amino-7-hydroxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon, UV λ max 396 nm (Ethanol).

Beispiel 5

7-Methoxy-6-acetylamino-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon:

27,85mg 7-methoxy-6-amino-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon werden in 0,5mL Eisessig gelöst, mit 0,15mL Acetanhydrid versetzt und 2 Stunden bei 20°C zur Reaktion gebracht. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der Rückstand mit Flash-Chromatographie (Kieselgel, Toluol/Aceton 1:1) gereinigt. Ausbeute: 30,7mg (99%). Fp 280°C (Toluol, dec), UV λ max 368nm, emissions max 448nm, IR 1680 (CO).

Beispiel 6



IIa

Umsetzung von 3-Amino-6,7-dimethoxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon mit Diethylentriaminpentaessigsäuredianhydrid (DTPA-dianhydrid) zu Anhydrid IIa laut allgemeiner Formel II Anspruch 3, $X = \text{NH-CO-CH}_2$:

3.6g DTPA-Dianhydrid und 0.6g der Aminoverbindung werden in 40 ml abs. Pyridin mit 50mg 4-Pyrrolidinopyridin erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit Ether verdünnt, der gebildete Niederschlag enthält das beschriebene Monoanhydrid (IIa) als Rohprodukt.

Beispiel 7

Hydrolyse des Anhydrids aus Beispiel 6 zur Tetraessigsäure (IIb) und Messung der Lumineszenzabklingzeit nach Komplexierung mit Europium³⁺:

Das Anhydrid IIa wird in 5ml Wasser aufgenommen, angesäuert und die gebildete Säure mittels präparativer HPLC gereinigt. (Gradient Wasser/Acetonitril, Lichrospher 100- RP18, Merck). Ausbeute beider Schritte 50%.

Fp: Zersetzung >180°C, UV λ max 368 nm, emissions max 459nm (Wasser).

Massenspektrum MALDI m/z 663.9, Sinapinsäure. Komplexierung der Säure (IIb) mit einem Equivalent Eu(III)chlorid bei pH 5-7 führt zu einem Produkt, das nach Anregung bei 370 nm die charakteristische Europiumlumineszenz mit scharfen Banden bei 578, 594, 615, 653 und 693 nm zeigt. Die Messung des Emissionsspektrums nach einer Mikrosekunde ergibt das praktisch idente Europiumspektrum ohne jede Eigenfluoreszenz des Carbostyryl-Chromophors. Die Messung der Lumineszenzabklingzeit ergibt 600 Mikrosekunden in Wasser (pH 7) und 990 Mikrosekunden in Dimethylsulfoxid.

Beispiel 8

Umsetzung des Anhydrids (IIa) mit 4-Nitro-L-phenylalanin und Reduktion zu Aminoverbindung IVa: Allgemeine Formel IV in Anspruch 4, Carbostyryl wie Formel IIa:

Das oben beschriebene Anhydrid (IIa), gebildet aus 100mg 3-Amino-6,7-dimethoxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon wird mit 4ml Pyridin, 250mg 4-Nitro-L-phenylalanin und 3 ml DMSO versetzt. Nach 4 stündigem Erhitzen auf 120 °C wird die Mischung abgekühlt, mit Ether versetzt und der gebildete Niederschlag wird in 15mL Wasser aufgenommen und bei 3-4 bar Wasserstoffdruck bei Raumtemperatur reduziert (Katalysator Pd/C).

Die Aminoverbindung (IVa) wird aus dem Filtrat mittels präparativer HPLC isoliert. Gesamtausbeute ausgehend von 3-Amino-6,7-dimethoxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon 20% (Gradient Wasser/Acetonitril, Lichrospher 100-RP18, Merck). Fp: Zersetzung >175°, UV λ max 369 nm, emissions max 454nm (DMSO).

Massenspektrum MALDI m/z 826.7, Sinapinsäure. Komplexierung der Aminoverbindung mit einem Equivalent Eu(III)chlorid bei pH 5-7 führt zu einem Produkt, das nach Anregung bei 370 nm die charakteristische Europiumlumineszenz mit scharfen Banden bei 578, 594, 615, 653 und 693 nm zeigt.

Beispiel 9

Umsetzung der Aminoverbindung (IVa) zu Isothiocyanat (Va), allgemeine Formel V in Anspruch 4, Carbostyryl wie in Formel IIa:

13 mg (IVa) in 10 ml 0.5M HCl werden zu 7.5 ml Thiophosgen und 1.3 ml CCl_4 gegeben. Die Mischung wird 1 Stunde bei 20 °C geführt, die wässrige Phase wird 5 mal mit 5 ml Chloroform gewaschen und das später eluierende Produkt wird dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Komplexierung von (Va) mit einem Equivalent Eu(III)chlorid bei pH 5-7 führt zu einem Produkt, das nach Anregung bei 370 nm die charakteristische Europiumlumineszenz mit scharfen Banden bei 578, 594, 615, 653 und 693 nm zeigt.

Beispiel 10

Umsetzung des Isothiocyanats (Va) mit dem Tripeptid Triglycin:

0.1 mg Isothiocyanat wird in Wasser/Acetonitril 90/10 mit 3 Equivalenten Triglycin 16 Std bei 20 Grad umgesetzt. Die Reaktionslösung wird mittels reversed phase HPLC aufgearbeitet und das rascher als das Reagens eluierende Produkt wird bei pH 5-7 mit etwa 1 Equivalent einer wässrigen Eu(III)-chloridlösung versetzt. Der resultierende Komplex zeigt nach Anregung bei 370 nm die charakteristische Europiumlumineszenz mit scharfen Banden bei 578, 594, 615, 653 und 693 nm.

Beispiel 11

Umsetzung der Aminoverbindung (IVa) mit Fluoresceinisothiocyanat zum Thioharnstoff und Herstellung eines lumineszierenden Europiumkomplexes mit zusätzlich kovalent gebundenem Fluoresceinchromophor:

1 mg Aminoverbindung (IVa) wird in Wasser/Acetonitril 90/10 mit einem Equivalent Fluoresceinisothiocyanat 16 Std. bei 20 Grad C umgesetzt. Die Reaktionslösung wird mittels reversed phase HPLC aufgearbeitet und das rascher als das Reagens

elulierende Produkt wird mit etwa einem Equivalent einer wässrigen Eu(III)-chloridlösung versetzt. Der resultierende Komplex zeigt nach Anregung bei 370 nm neben der Eigenfluoreszenz des Fluoresceinchromophors (Maximum 516nm) nahezu unverändert die charakteristische Europiumlumineszenz mit scharfen Banden bei 578, 594, 615, 653 und 693 nm, wie sie auch ohne Fluorescein zu beobachten war.

Beispiel 12

Abhängigkeit der Lumineszenzabklingzeit der mit Europium (III) komplexierten Säure (IIb) vom pH in Anwesenheit des Indikatorfarbstoffs Bromthymolblau (BTB): BTB ist im unprotonierten Zustand blau und im protonierten Zustand gelb. Nur die blaue Form führt zu einer Erniedrigung der Lumineszenzabklingzeit des Europiumkomplexes von Säure (IIb) und den in Beispiel 9 und 10 angeführten, mit Europium komplexierten Derivaten.

Nach Herstellung einer Mischung von BTB mit Säure (IIb) in Wasser wird eine signifikante Abnahme der Lumineszenzabklingzeit zwischen pH 3 und pH 7 beobachtet. Durch Einbetten der Komponenten in eine Sol-Gel-Matrix oder durch Immobilisierung und Wahl eines geeigneten, zwischen 570 und 710 nm absorbierenden Farbstoffs, kann dieser pH Bereich in den jeweils gewünschten Anwendungsbereich verschoben werden.

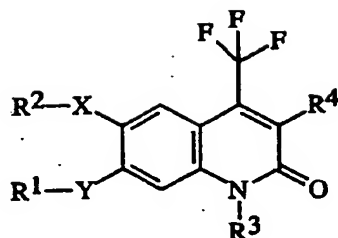
Beispiel 13

3-Amino-6,7-dimethoxy-1-methyl-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinollinon und analoge N-funktionalisierte Derivate des 6,7-dimethoxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinons: 1g 6,7-Dimethoxy-3-nitro-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon wird in Aceton mit

Überschüssigem Kaliumkarbonat und zwei Äquivalenten Dimethylsulfat 3 h bei 20°C gerührt. Es wird filtriert und eingeengt, das Produkt wird mittels Flash-Chromatographie gereinigt. Fp 254°C. Die Verbindung wird in Ethanol mit 5% Platinoxid und 3 bar Wasserstoffdruck zur entsprechenden 3-Aminoverbindung reduziert. Ausbeute 50% über beide Stufen. Ebenso kann das 1-Phthalimidomethyl-6,7-dimethoxy-3-nitro-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon mit Brommethylphthalimid, das 3-Nitro-1-(4-nitrobenzyl)-6,7-dimethoxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon (Fp 184°C) mit 4-Nitrobenzylbromid hergestellt werden. Die Reduktion von 3-Nitro-1-(4-nitrobenzyl)-6,7-dimethoxy-4-trifluormethyl-2-(1H)-chinolinon mit Platinoxid in Ethanol (2 bar Wasserstoffdruck 5 h) ergibt die entsprechende Diaminoverbindung.

Patentansprüche:

Anspruch 1:

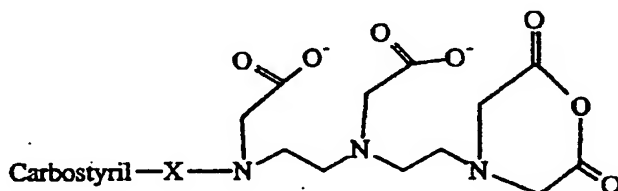


Formel I

Ein substituiertes 4-Trifluormethylcarbo-styryl gemäß obiger Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Absorptionsmaximum zwischen 350 und 420 nm und ein Lumineszenzmaximum zwischen 430 und 900nm aufweist, wobei die bezeichneten Gruppen X und Y die Bedeutung NH, N-Alkyl und Sauerstoff in einer beliebigen Kombination haben, R¹ und R² entweder ein über X und Y gemeinsam gebundenes Methylen, 1,2 Ethylen, 1,3-Propylen bedeutet oder in einer beliebigen Kombination Wasserstoff, Alkyl von C₁ bis C₁₁ und gegebenenfalls mit funktionalisierten Gruppen substituiertes Alkyl, das zur Komplexierung von Metallionen geeignet ist oder zur Bindung des Moleküls an passende Gruppen eines Zielmoleküls oder festen Trägermaterials dient, bedeuten und die Reste R³ und R⁴ neben der des Wasserstoffs die Bedeutung haben, daß entweder einer davon Wasserstoff ist und der andere Rest zur Komplexierung von Metallionen geeignet ist bzw. eine Funktion zur Bindung des Moleküls an passende Gruppen eines Zielmoleküls oder festen Trägermaterials trägt oder daß dieser andere Rest

Anspruch 2:

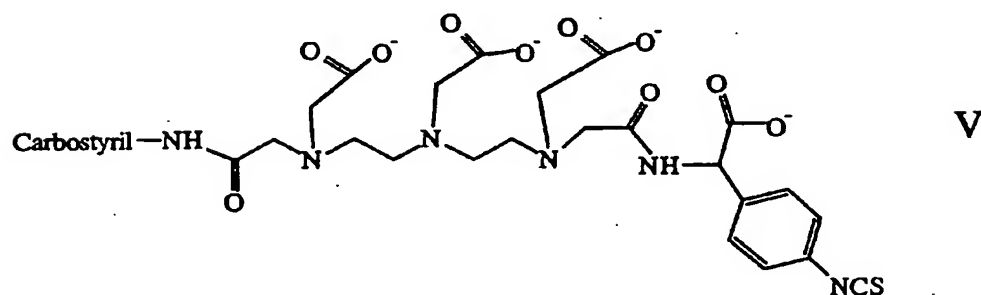
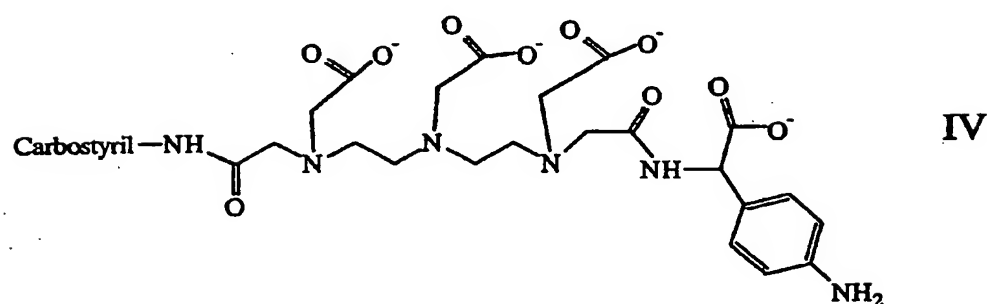
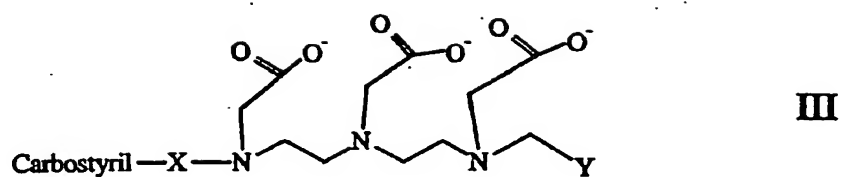
Anspruch 3:



II

17

Anspruch 4:



Ein substituiertes Trifluormethylcarboxystyryl nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Seitenkette wie in Formel III, IV und V trägt, wobei X in Formel III die Bedeutung wie in Formel II hat und Y eine Funktion mit einer zusätzlichen Carboxylatgruppe an beliebiger Stelle sein kann und die Kationen beliebig sein können.

Anspruch 5:

Ein substituiertes Carbostyryl nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß dessen Seitenkette mit einem dreiwertigen Europium- oder Terblumion komplexiert ist.

Anspruch 6:

Ein substituiertes Carbostyryl nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß das bei einem Absorptionsmaximum von 350 -420 nm und Einstrahlung in diesem Bereich ein typisches Emissionsspektrum aktivierter Europiumkomplexe zwischen 580 und 900 nm aufweist.

Anspruch 7:

Die Verwendung eines substituierten Carbostyryls nach Anspruch 1, 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß es in einer Sol-Gel Matrix oder nach einer eventuellen kovalenten Immobilisierung zur Messung von Lumineszenzspektren herangezogen wird.

Anspruch 8:

Die Verwendung eines substituierten Carbostyryls nach Anspruch 1, 5, 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß es in einer Sol-Gel Matrix oder nach einer eventuellen kovalenten Immobilisierung zur Messung von Lumineszenzspektren nach einer Abklingzeit von 10 bis 3000 Mikrosekunden herangezogen wird.

Anspruch 9:

Die Verwendung eines substituierten Carbostyrils nach Anspruch 1,5,6 und 7 dadurch gekennzeichnet, daß Lumineszenz-abklingzeiten im Bereich von 10 - 3000 Mikrosekunden gemessen werden.

Anspruch 10:

Die Verwendung eines substituierten Carbostyrils nach Anspruch 1,5,6,7 und 8 dadurch gekennzeichnet, daß Lumineszenzmessungen nach Immobilisierung an einem Zielmolekül oder an einem festen Trägermaterial erfolgen.

Anspruch 11:

Methode zur Messung von Lumineszenzeffekten dadurch gekennzeichnet, daß ein substituiertes Carbostyryl gemäß Anspruch 1 vor oder nach einer eventuellen Immobilisierung mit Europium komplexiert wird und daß an diesem Komplex nach Kontakt mit einem geeigneten Analyten Änderungen der Effekte und Abklingzeiten gemessen werden.

Anspruch 12:

Methode zur Messung von Lumineszenzspektren gekennzeichnet dadurch, daß ein substituiertes Carbostyryl gemäß Anspruch 1 mit Europium³⁺ komplexiert wird und daß dieser Komplex zusätzlich mit einem direkt gebundenen oder freien Farbstoffmolekül absorbierend im Bereich 580-710 nm als Template in Kontakt gebracht wird und daß nach Kontakt mit einem geeigneten Analyten Lumineszenzeffekte und Abklingzeiten gemessen werden.

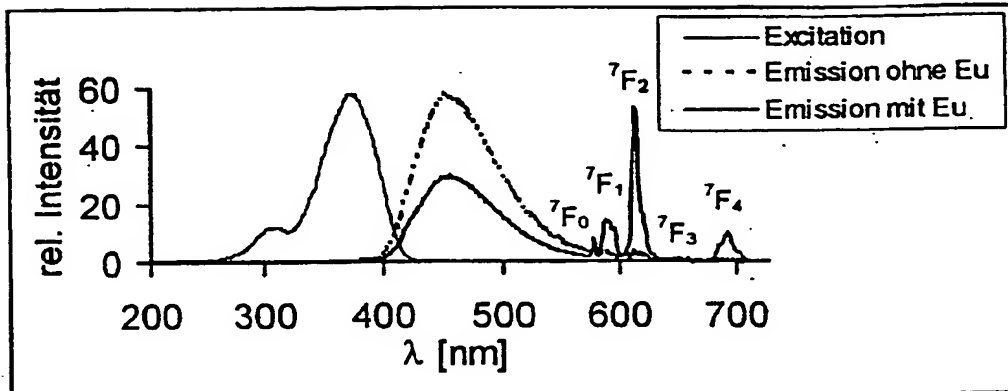


Abbildung a: